

18/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003187892

WPI Acc No: 1981-48444D/198127

**Fermentative prodn. of coenzyme-Q - in culture medium contg. cysteine  
opt. mixed with choline or betaine**

Patent Assignee: MITSUBISHI GAS CHEM IND CO LTD (MITN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 56055196	A	19810515				198127 B
JP 82001984	B	19820113				198205

Priority Applications (No Type Date): JP 79129621 A 19791008

Abstract (Basic): JP 56055196 A

In culturing a coenzyme Q-producing microorganism, the microorganism is cultured on a medium or broth contg. cysteine opt. mixed with choline or betaine in order to enhance the productivity of coenzyme Q in the organism.

Coenzyme Q-producing microorganisms include *Pseudomonas extraquens*,

*P.rosea*, *Microcycilus aquaticus*, *M.ebruneus*, *Protaminobacter ruber*, *Paracoccus denitrificans*, *Xanthomonas ampelina*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Candida curvata*, *C.humicola*,

*Torulopsis*

*capsuligenus*, *Rhodotolura glutinis*, *Rh. rubra*, *Cryptococcus albidus*,

*Sporobolomyces holsaticus*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia aganobii*, *Trichosporon cutaneum*.

The addn. of cysteine and opt. choline or betaine markedly increases productivity without decreasing growth rate of the organism.

Title Terms: FERMENTATION; PRODUCE; COENZYME-Q; CULTURE; MEDIUM; CONTAIN;

CYSTEINE; OPTION; MIX; CHOLINE; BETAINE

Derwent Class: B05

International Patent Class (Additional): C12N-001/38; C12P-007/66;

C12R-001/01

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C1; E10-A06; E10-B02D

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* G018 G100 H5 H522 H7 H721 H722 H723 H8 K0 L9 L951 M210 M211 M215  
M220 M224 M225 M226 M232 M240 M272 M282 M320 M414 M510 M520 M531  
M540 M720 M903 N131 N132 V0 V801

Derwent Registry Numbers: 0231-S; 0829-S; 1628-S

?

51 Int. Cl.<sup>3</sup>

C 12 N	1/38
// C 12 P	7/66
( C 12 N	1/38
C 12 R	1/38
	1/64
	1/05
	1/01
	1/72
	1/88
	1/78
	1/84
	1/645)

識別記号

厅内整理番号  
 7235—4 B  
 6760—4 B

④公開 昭和56年(1981)5月15日

発明の数 1  
審査請求 有

(全 6 頁)

#### ⑤④微生物の培養方法

新潟市宝町 5 の33

②特 願 昭54-129621

⑦出願人 三菱瓦斯化学株式会社

②出願 昭54(1979)10月8日

東京都千代田区丸の内2丁目5  
番2号

⑦發明者 蝦名誠治

男 組 書

## 1 発明の名称

微生物の培養方法

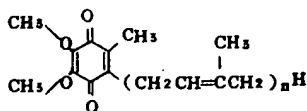
## 2. 特許請求の範囲

補酵素Qを生産する微生物を培養するに際し、培地または培養液中にシステイン単独またはシステインとコリンもしくはベタイン類との両者を含有させて該微生物を培養して微生物菌体の補酵素Qの生産性を増大させることを特徴とする微生物の培養方法。

### 5 発明の詳細な説明

本発明は補酵素Qを生産する微生物を培養する方法に関し、さらに詳細には微生物菌体の補酵素Qの生産性を増大させるための補酵素Qを生産する微生物を培養する方法に係わる。

補酵素Qは一般式



(ただし式中  $n$  は 6 ~ 12 の整数)

で示される化合物であり、 $n$ が8、9または10の化合物が医薬などとして有用であり、特に $n$ が10の化合物が医薬として広く使用されている。

補酵素Qは一般に工業的には微生物的方法により製造されているが、この工業的製造法においては微生物は増殖速度が大きくしかも生産管理が極めて容易であるとの多くの長所を有するが、反面、菌体の補酵素Qの含有率が低くそのために生産性が低いことが大きな欠点とされている。

本発明者は、菌体の補酵素Qの含有率を増大させるため、各種培養条件などを検討した結果、培地または培養液に特定の化合物を単独または併用添加することにより菌の増殖速度を低下させることなく、しかも補酵素Qの含有率が増大し、もつて生産性を増大させ得るとの新知見を得、この新知見に基づいて本発明に到達した。

すなわち、本発明は補酵素Qを生産する微生物

物を培養するに際し、培地中にシステイン単独またはシステインとコリンもしくはベタイン類との両者を含有させて該微生物を培養して微生物菌体の補酵素Qの生産性を増大させることを特徴とする微生物の培養方法である。

本発明での補酵素Qを生産する微生物とは補酵素Qを生産するものであれば特に制限はなく、たとえば細菌および酵母などがある。細菌としてはたとえばシュードモナス エクストラクエンス (*Pseudomonas extraquens*) およびシュードモナス ローゼア (*Pse. rosea*) などのシュードモナス属、マイクロチクルス アクユアティクス (*Microcycilus aquaticus*) およびマイクロチクルス エブルネウス (*Microcycilus ebruneus*) などのマイクロチクルス属、プロタミノバクテールバー (*Protaminobacter ruber*) などのプロタミノバクテール属、パラコツカス デニトリフィカンス (*Paracoccus denitrificans*) などのパラコツカス属、キ

サントモナス アムペリナ (*Xanthomonas ampelina*) などのキサントモナス属、アグロバクテリウム チュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) などのアグロバクテリウム属、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) などのアルカリゲネス属、ロドスピリラム ルブラム (*Rhodospirillum rubrum*) などのロドスピリラム属ならびにロドシュードモナス スフェロイデス (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) などのロドシュードモナス属などに属する細菌などがあり、これらのうちでパラコツカス属、シュードモナス属、ロドスピリラム属およびロドシュードモナス属に属する細菌が好ましい。

また酵母としては、キャンディダ クルバータ (*Candida curvata*) およびキャンディダ ヒューミコラ (*Cand. humicola*) などのキャンディダ属、トルロプシス カプシユリゲネス (*Torulopsis capsuligenus*) などのトルロプシス属、ロドトルラ グルチニス (*Rhodotulura glutinis*)

およびロドトルラ ルブラ (*Rhod. rubra*) などのロドトルラ属、クリプトコツカス アルビダス (*Cryptococcus albidus*) などのクリプトコツカス属、スポロボロマイセス ホルサティカス (*Sporobolomyces hol-saticus*) などのスポロボロマイセス属、ハンセヌラ ポリホルファ (*Hansenula polymorpha*) などのハンセヌラ属、ピチア アガノビ (*Pichia aganobii*) などのピチア属ならびにトリコスポロン クタニウム (*Trichosporon cutaneum*) などのトリコスポロン属などに属する酵母などがあり、これらのうちでキャンディダ属、トルロプシス属、ロドトルラ属およびクリプトコツカス属などに属する酵母が好ましく、またスポロボロマイセス属およびトリコスポロン属に属する酵母が特に好ましい。

培地または培養液中に含有せしめられる特定の化合物とはシステイン単独またはシステインとコリンもしくはベタイン類との両者である。

システインとして、L-システイン、D-L-

システインおよびD-システインのいずれをも使用し得るが、実用上L-システインおよびD-システインを使用することが好ましい。

コリンとは、 $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3))^+\text{OH}^-$  で示される化合物である。また水中でコリンを生成する化合物たとえば塩化コリンおよびコリンのくえん酸塩などのコリン塩なども使用しうる。

ベタイン類は、分子中に陽イオンとして第4級アンモニウムを、また陰イオンとしてカルボン酸をもつた分子内塩であつて、このうち、実上好ましいベタイン類はグリシンベタインおよびアーブチロベタインなどであり、これらのうちグリシンベタインが最も好ましい。グリシンベタインのほかに水中でグリシンベタインを生成する化合物たとえばグリシンベタインの塩酸塩などのグリシンベタイン塩を使用することができる。

システイン、コリンおよびベタイン類の培地または培養液中のそれぞれの濃度は微生物の生育または増殖を著しく抑制しない濃度であれば

よい。また、これらの濃度は培養時の培養液の菌体濃度により多少異なる。たとえばシステインを単独に添加する場合の濃度は0.2wt%以下、好ましくは0.005~0.05wt%とすることが好ましい。システインとコリンまたは、システインとベタイン類を併用添加する場合には、システインの濃度は0.2wt%以下、好ましくは0.005~0.05wt%であり、コリンもしくはベタイン類の濃度は0.5wt%以下、0.01~0.3wt%とすることが好ましい。システインとコリンまたはシステインとベタイン類を併用添加した場合にはシステイン単独添加およびコリンもしくはベタイン類の単独添加の場合に得られるそれぞれの生産性の相乗効果が認められ、工業的価値は極めて大きい。

培養は回分式および連続式のいずれによつても可能である。これらの特定の化合物は、回分培養のときは通常は培養前培地または培養液中の培養液に含有させる。連続培養のときは通

常は培養前の培地に含有させる。他の培地成分は常法の如くでよく、使用する微生物の種類などに応じて通常使用されている培地成分から適宜選択される。

炭素源は、使用する微生物が酸化しうる物質であればよく、たとえば糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物あるいはグルコースおよびフラクトースなどの糖類、メタノール、エタノールおよび1-プロパノールなどのアルコール類、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドなどのアルデヒド類、メチルアミン、ジメチルアミンおよびトリメチルアミンなどのアミン類、酢酸、ギ酸、ピルビン酸およびオキサロ酸などの有機酸ならびにパラフィンなどの炭化水素などである。窒素源としては硫酸安および塩安などのアンモニウム塩、ならびに尿素、コーンステイブリーカー、カゼイン、ペプトンおよび酵母エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。その他、無機化合物としてはたとえばカルシウム化合物、ナトリウム化合物、リン酸塩、マン

ガン化合物、亜鉛化合物、鉄化合物、モリブデン化合物、コバルト化合物、ほう素化合物およびよう素化合物などが用いられる。さらに、ビタミン類およびアミノ酸などの生育に必須な物質あるいは生長促進物質を添加することが好ましい。

培養濃度および培養pHなどの培養条件は使用される微生物の生育または増殖が阻害されないような通常の培養条件を適宜決定すればよい。細菌を使用する場合には実用上、培養温度はたとえば20~45℃、培養pHはたとえば5~8から適宜選択される。また酵母を使用する場合には実用上培養温度はたとえば20~40℃、培養pHはたとえば2~6から適宜選択される。

本発明によると、微生物の増殖速度を低下させることなく菌体の補酵素Q<sub>10</sub>の含有率のみならず他の補酵素Qの含有率も増大せしめられ、もつて補酵素Qの生産性が増大せしめられ工業的価値は極めて大きい。

実施例により本発明をさらに具体的に説明す

る。

#### 実施例 1

下記の基礎培地を使用して28℃で12時間振とう培養して得られたパラコツカス デニトリフィカンス (IFO 13301) の培養液を前培養液として本培養を行なつた。

#### 基礎培地組成

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
酵母エキス	0.1 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 mg
CaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mg
MnC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1 mg
エタノール	10 g

これに蒸留水を加えて1ℓとする。

pH 7.2

本培養では前記の基礎培地にさらにL-システインを添加し培地中のL-システイン濃度を種々変えて作成した培地150mlを1号容フラスコに入れ120℃で15分間高圧蒸気滅菌したのち、前培養液0.2mlを添加し、30℃で12時間回転振とう(220r.p.m.)培養をくりかえした。この培養液を各濃度ごとに1.5gずつ集め、菌体を分離した。結果を第1表に示した。

第1表

培地L-システイン濃度 (wt%)	世代時間 (時間)	補酵素Q <sub>10</sub> 含有率 (μg/g乾燥菌体)	2号移入
0.10	2.2	1228	
0.05	2.0	1230	
0.02	2.0	1230	
0.01	2.0	1228	
0.005	2.0	1230	
0.002	2.0	1200	
0	2.0	1070	

-11-

特開昭56-55196(4)

なお、菌体からの補酵素Q<sub>10</sub>の抽出は次のようにして行なつた。すなわち、湿菌体5gにエタノール30ml、ピロガロール2g、および60% (W/V) 苛性ソーダ水溶液5mlを混合し、この液を還流下で25分間けん化を行ない、けん化終了後急冷し、これに50mlの水を加え、n-ヘキサンで3度抽出し、得られたヘキサン層を3度水洗し、ついでヘキサン層に残存する水を無水芒硝で脱水したのちヘキサン層を減圧濃縮して乾固した。

補酵素Q<sub>10</sub>の定量は、クラベン法(CRAVEN'S TEST) ("METHODS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS" VOL. XI) に準じた。すなわち上記の乾固した試料をエタノールに溶解し、これにエタノール性0.2N苛性カリ液およびシアノ酢酸エチルを加えて補酵素Q<sub>10</sub>を発色せしめ625mμの吸光度を測定し、予め標準補酵素Q<sub>10</sub>により得た検量線により含有量を算出した。なお補酵素Q<sub>10</sub>の抽出および定量は、以下の実施例および比較例でも同様に行なつた。

-12-

#### 実施例 2

実施例1で使用した基礎培地にL-システイン塩酸塩および塩化コリンを培地中のそれぞれの濃度が0.02wt%および0.1wt%になるように添加した以外は全く同様に行なつた。その結果、世代時間は2.0時間および補酵素Q<sub>10</sub>含有率は1562μg/g乾燥菌体であつた。

#### 実施例 3

実施例1で使用した基礎培地に、L-システインおよびグリシンベタインを培地中のそれぞれの濃度が0.02wt%および0.1wt%になるように添加した以外は全く同様に行なつた。その結果、世代時間は2.0時間および補酵素Q<sub>10</sub>含有率は1540μg/g乾燥菌体であつた。

#### 比較例 1

実施例2においてL-システインを添加しな

い他は全く同様に行なつたところ、世代時間は2.0時間であり、補酵素Q<sub>10</sub>含有率は1310μg/g乾燥菌体であつた。

#### 比較例 2

実施例3においてL-システインを添加しない他は全く同様に行なつたところ、世代時間は2.0時間であり、補酵素Q<sub>10</sub>含有率は1290μg/g乾燥菌体であつた。

#### 比較例 3

実施例2においてL-システイン塩酸塩および塩化コリンのいずれをも加えなかつた以外は全く同様に行なつた。その結果、世代時間は2.0時間、および補酵素Q<sub>10</sub>含有率は1090μg/g乾燥菌体であつた。

#### 実施例 4

酵母スポロボロマイセスホルサティカス(IFO 1032)を以下の培地組成で28

-13-

-14-

てで振とう培養を行なった。

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0 g、  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g、NaCl 0.1 g、酵母  
エキス 0.2 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50 mg、  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 30 mg、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg、  
MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10 mg、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.2 mg、  
エタノール 1.0 g

これに蒸留水を加え1ℓとし、pHを4.7  
に調整して基礎培地とした。

前記基礎培地に塩化コリンおよびL-システ  
インを培地中のそれぞれの濃度が0.1wt%  
および0.02wt%になるように添加して、約  
48時間培養したのち集菌し、以下実施例1と  
同様にして補酵素Q<sub>10</sub>の含有率を測定したとこ  
ろ960μg/g乾燥菌体であり、また、世代  
時間は8.7時間であつた。

#### 実施例 5

実施例4で用いた基礎培地にL-システイン  
を培地中の濃度が0.02wt%になるように

-15-

#### 比較例 5

トリコスポロン クタニウム (IFO 1  
200) を用い、塩化コリンおよびL-システ  
インのいずれをも添加しないほかは実施例6  
と同様にして行なつたところ補酵素Q<sub>10</sub>含有率  
は750μg/g乾燥菌体であり、また、世代  
時間は6.5時間であつた。

#### 実施例 7

ロドスピリラム ルブラム (IFO 39  
86) を用い、実施例1で使用した基礎培地  
に塩化コリンおよびL-システインを培地中の  
それぞれの濃度が0.1wt%、および0.0  
2wt%となるように加え、さらにNaHCO<sub>3</sub>  
0.3gを添加した培地を作成し、1ℓフラス  
コに培地 350mlを張り込み220rpm、  
30℃の条件で暗室で振とう培養を行なった。  
約48時間後に集菌し、補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測  
定したところ3410μg/g乾燥菌体であり、  
また、世代時間は9.0時間であつた。

-17-

添加した他は全く同様にして行なつたところ、  
補酵素Q<sub>10</sub>の含有率は670μg/g乾燥菌体  
であり、また、世代時間は8.7時間であつた。

#### 比較例 4

実施例4において、塩化コリンおよびL-シ  
ステインのいずれをも添加しない以外は全く同  
様に行なつたところ補酵素Q<sub>10</sub>の含有率は60  
0μg/g乾燥菌体であり、また、世代時間は  
8.7時間であつた。

#### 実施例 6

トリコスポロン クタニウム (IFO 1  
200) を実施例4で用いた基礎培地に、塩  
化コリンおよびL-システインを培地中のそれ  
ぞれの濃度が0.1wt% および0.02wt%  
になるように添加して培養を行なつたところ、  
得られた菌体の補酵素Q<sub>10</sub>含有率は1190μg  
/g乾燥菌体であり、また、世代時間は6.5  
時間であつた。

-16-

#### 実施例 8

ロドスピリラム ルブラム (IFO 39  
86) を用い、実施例1の基礎培地にL-シ  
ステインを培地中の濃度が0.002wt%と  
なるように添加し、さらにNaHCO<sub>3</sub> 0.3gを  
添加した培地を作成し、実施例7と同様な条件  
で培養を行ない、得られた菌体の補酵素Q<sub>10</sub>の  
含有率を測定したところ2200μg/g乾燥  
菌体であり、また、世代時間は9.0時間であ  
つた。

#### 比較例 6

実施例8でL-システインを添加しないほか  
は全く同様にして行なつたところ、補酵素Q<sub>10</sub>  
含有率は2550μg/g乾燥菌体であり、ま  
た、世代時間は9.0時間であつた。

#### 実施例 9

ロドシユードモナス スフェロイデス (I  
FO 12203) を用い、実施例1で用い

-18-

た基礎培地に、グリシンおよびDL-<sup>1</sup>字挿入  
ーシステインを培地中のそれぞれの濃度が0、  
10wt%および0.02wt%となるように  
添加しさらにNaHCO<sub>3</sub> 0.5gを添加した培地  
を1ℓフラスコに200ml張り込み220rpm、  
30℃の条件で暗室にて振とう培養を行なった。  
約48時間後に集菌し、補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測  
定したところ1080μg/g乾燥菌体であり、  
また、世代時間は5.5時間であつた。

#### 比較例 7

実施例9でグリシンベタインおよびDL-  
ーシステインのいずれをも添加しなかつた以外は全  
く同様にして行ない、得られた菌体の補酵素Q<sub>10</sub>  
含有率を測定したところ720μg/g乾燥菌  
体であり、また、世代時間は5.5時間であつ  
た。

#### 実施例 10

シュードモナス ローゼア (NCIB 1

-19-

#### 手続補正書 (自発)

昭和55年 〇月 〇日

特許庁長官 川原 能雄 殿

#### 1. 事件の表示

昭和54年 特許第 第129621号

#### 2. 発明の名称

微生物の培養方法

#### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 (〒100) 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

名称 (446) 三菱瓦斯化学株式会社

代表者 相 川 泰 吉

(電話番号 283-5125-5130)

#### 4. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

- 1 -

特開昭56- 55196(6)

0610) を実施例1の基礎培地で炭素源を  
エタノールからメタノールに変えて、さらに塩  
化コリンおよびL-システインを培地中のそれ  
ぞれの濃度が0.1wt%および0.02wt%  
となるように添加した培地で培養した以外は実  
施例1と同様にして得られた菌体の補酵素Q<sub>10</sub>  
含有率を測定したところ1115μg/g乾燥  
菌体であり、また、世代時間は3.5時間であ  
つた。

#### 比較例 8

実施例10で、塩化コリンおよびL-システ  
インのいずれをも添加しなかつた他は全く同様  
にして行ない、得られた菌体の補酵素Q<sub>10</sub>含有  
率を測定したところ770μg/g乾燥菌体で  
あり、また、世代時間は3.5時間であつた。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社

代表者 相 川 泰 吉

-20-

#### 5. 補正の内容

(1) 第5頁第7行 「ポリホルファ」を「ポリ  
モルフア」に訂正する。

(2) 第18頁第4行 「0.002」を抹消し、  
「0.02」を挿入する。

(3) 第18頁第12行 「実施例8」を「実施  
例7」に訂正する。

(4) 第18頁第15行 比較例6の末尾につ  
けてつぎの比較例7を挿入する。

「比較例 7

実施例7において塩化コリンおよびL-  
システインのいずれをも添加しないほかは全く  
同様にして行なつたところ、補酵素Q<sub>10</sub>含有  
率は1980μg/g乾燥菌体であり、また、  
世代時間は9.0時間であつた。」

(5) 第19頁第10行 「比較例7」を「比較  
例8」に訂正する。

(6) 第20頁第10行 「比較例8」を「比較  
例9」に訂正する。

- 2 -